

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

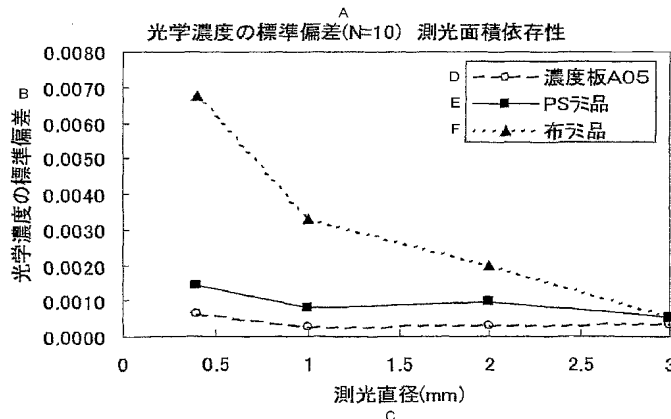
(10) 国際公開番号
WO 2005/080979 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/52 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 健太郎 (NAKAMURA, Kentaro) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP). 川崎 和也 (KAWASAKI, Kazuya) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP). 境野 佳樹 (SAKAINO, Yoshiki) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP). 伊藤 敏古 (ITO, Toshihisa) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP). 瀬志本 修 (SESHIMOTO, Osamu) [JP/JP]; 〒3518585 埼玉県朝霞市泉水 3-1-1-46 富士写真フイルム株式会社内 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003085
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 18 日 (18.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-044391 2004 年 2 月 20 日 (20.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士写真フイルム株式会社 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2500193 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: MULTILAYER ANALYTICAL ELEMENT

(54) 発明の名称: 多層分析要素



A... STANDARD DEVIATION OF OPTICAL DENSITY (N=10) DEPENDENCE ON PHOTOMETRIC AREA
 B... STANDARD DEVIATION OF OPTICAL DENSITY
 C... PHOTOMETRIC DIAM. (mm)
 D... DENSITY PLATE A05
 E... PS LAMINATE
 F... CLOTH LAMINATE

(57) Abstract: A multilayer analytical element that realizes reduced inter-lot variation and intra-lot variation, ensuring high measurement accuracy and can be miniaturized. There is provided a multilayer analytical material for liquid sample analysis comprising a water impermeable planar support and, superimposed in sequence on one surface thereof and unified, at least one functional layer and at least one non-fibrous porous film, these constituting a porous liquid sample development layer. In particular, the multilayer analytical material for liquid sample analysis is a multilayer analytical element for liquid sample analysis wherein the non-fibrous porous film exhibits a flexing breaking strength of 20 gf or more and also exhibits an elongation at pulling with 50 gf of 2% or below.

(57) 要約: 本発明の目的は、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化が可能な多層分析要素を提供することである。本発明によれば、水不透透性平面支持体の片面上に、少なくとも1つの機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層—

[続葉有]



WO 2005/080979 A1



(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

多層分析要素

技術分野

本発明は、臨床検査、食品検査又は環境分析等に用いられる多層分析要素に関する。

背景技術

臨床検査、食品検査及び環境分析の分野では、迅速・簡便に検体を処理する要求が年々高くなっており、そのニーズに応えた分析素子が汎用されている。分析要素の中で、血液の受容、展開、拡散を行わせる展開層には、特開昭55-164356号公報、特開昭57-66359号公報、特開昭60-222769号公報等に代表されるように、繊維質多孔性材料が用いられてきた。

この繊維質多孔性材料は、液体試料点着時の展開が速く、製造時の取り扱い性にも優れている。また、全血のような粘性のある試料に対しても適用性があり、広く使用されている。

しかし、この分野では、より高い精度（再現性）での測定が要求されるようになってきており、繊維質多孔性材料（布展開層）では、いくつか不具合がでてきている。その一つが、布自身のロット変動の問題である。通常、布展開層には、織物と編物があるが、その織り方、編み方にロット間差及びロット内差が見つかっている。具体的には、単位面積当たりの編目数、単位面積当たりの重量、厚みなどである。また、中間工程で、材料の洗浄工程があるが、その洗浄の程度により、布の親水性にロット間差、ロット内差がある。さらに、布展開層は、平滑ではないため、積層方式で、十分な接着力を確保して製造しようとする、下層に展開層を食い込ませざるを得ない。これにより下層は乱れており、より高い精度での測定に対しては、好ましくない。また布は下層に布を接着する際に、その構造上伸びやすく、空隙体積の変化を起こしやすい。そのために液体試料点着時の

展開面積が変化しやすく、ロット内差及び高精度測定が達成できない原因となっている。また近年、より少ない試料で測定することが望まれているが、布展開層では、試料液量を少なくしていくと、編目の影響による反射光量のバラツキが顕著になり、高精度の測定ができなくなる。

上述したような布展開層の欠点を解決する手段として、非繊維質多孔性膜を展開層に用いた分析素子が検討されている。非繊維質多孔性膜は塗布により製膜されるために、その製膜精度は非常に高く、またロット間差、ロット内差なども十分に小さい。また、これら非繊維質多孔性膜は、布展開層に比べ、平滑で、かつ、比表面積が大きいことから、下層への食い込みは少ない状態で、下層と所望の強さでの接着が可能である。さらに、布展開層に代表される編目はなく、白色度も高いため、分析素子の面積を小さくしても、反射光量のバラツキは安定しており、高精度の測光が可能である。そのような観点から、特公昭 5 3 - 2 1 6 7 7 号公報、特公平 1 - 3 3 7 8 2 号公報には、セルロースエステル類からなる非繊維質多孔性膜からなる展開層が挙げられているが、これらの膜は、強度が十分でなく、製造時の取り扱いにおいて、問題が生じる場合があり、安定した製造を実施することが困難である。

発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明の目的は、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化が可能な多層分析要素を提供することである。本発明の別の目的は、安定した製造が可能となるような多層分析要素を提供することである。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、折り曲げ破壊強度が 20 g 重以上であり、50 g 重で引っ張った時の伸張率が 2 % 以下である非繊維質多孔膜を展開層として用いることによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも 1 つの

機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析材料において、該非繊維性多孔膜の折り曲げ破壊強度が20g重以上であり、かつ50g重で引っ張った時の伸張率が2%以下である液体試料分析用多層分析要素が提供される。

好ましくは、非繊維性多孔膜は有機高分子からなる多孔膜である。

好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は非対称性多孔膜であり、非対称率は2.0以上であるか、あるいは有機高分子からなる多孔膜は対称性多孔膜であり、非対称率は2.0未満である。

好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は6, 6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、またはこれらの混合物である。

さらに好ましくは、有機高分子からなる多孔膜は、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、またはこれらの混合物である。

特に好ましくは、有機高分子からなる多孔膜はポリエーテルスルホン、ポリス

ルホン、またはこれらの混合物である。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で用いた測光系の光学配置を示す。100 は物質質量測定装置 1 は検体設置部、2 は光源、3 は光可変部、4 は波長可変部、5 a, 5 b, 5 c はレンズ、6 はエリアセンサ、7 はコンピュータを示す。

図 2 は、光学濃度の標準偏差 (SD) と測光面積との関係を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の液体試料分析用多層分析要素は、水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも 1 つの機能層と少なくとも 1 つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化されたものであり、該非繊維性多孔膜の折り曲げ破壊強度が 20 g 重以上であり、かつ 50 g 重で引っ張った時の伸張率が 2 % 以下であることを特徴とする。

本発明においては、折り曲げ破壊強度が 20 g 重以上であり、かつ 50 g 重で引っ張った時の伸張率が 2 % 以下である非繊維性多孔膜を多孔性液体試料展開層として用いるという特徴により、製造時の展開層の切れ（展開層と下層との接着工程）等が発生しないという効果が得られ、また伸張率が低いことで空隙体積が変化しないという効果が得られる。これにより、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化可能で、さらに製造の安定化が可能になる多層分析要素を提供することができる。

本発明において、多孔性液体試料展開層として用いる非繊維性多孔膜の折り曲げ破壊強度は 20 g 重以上であり、好ましくは 30 g 重以上であり、さらに好ましくは 50 g 重以上である。本発明における折り曲げ破壊強度は、2 cm（幅）× 5 cm（長さ）の多孔膜を折り曲げ、できたループ部分に所定の重量の分銅をのせ、多孔膜が切れて破壊される時の加重を求めることで測定することができる。

本発明において、多孔性液体試料展開層として用いる非繊維性多孔膜の50 g重で引っ張った時の伸張率は2 %以下であり、好ましくは1 %以下であり、さらに好ましくは0.5 %以下であり、特に好ましくは0.1 %以下であり、最も好ましくは0.0 %である。本発明における50 g重で引っ張った時の伸張率は、非繊維性多孔膜を2 cm×8 cmの短冊状に切り取り、膜の両端にテープを貼り、片方に穴を開け、穴の開いていない側をクリップで固定し、吊るした状態にし、無負荷状態での短冊の長さを測定し、その後穴に50 g重の分銅を吊り下げ、負荷状態での短冊の長さを測定し、両者（即ち、無負荷状態での短冊の長さ、及び負荷状態での短冊の長さ）の長さの比率を算出することにより求めることができる。

水不透過性平面支持体としては、従来公知の分析要素に用いられている水不透過性の支持体を用いることができる。水不透過性支持体の例としては、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカルボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等のポリマーからなる厚さ約50 μmから約1 mm、好ましくは約80 μmから約300 μmの範囲のフィルムもしくはシート状の透明支持体を挙げるることができる。

支持体の表面には必要により下塗層を設けて、支持体の上に設けられる機能層と支持体との接着を強固なものにすることができる。また、下塗層の代りに、支持体の表面を物理的あるいは化学的な活性化処理を施して接着力の向上を図ってもよい。

本発明の多層分析要素は、少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層を含む。多孔性液体試料展開層は、水性の検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなしに平面的に拡げ、単位面積当りほぼ一定量の割合で、機能層に供給する機能を有する層である。

多孔性液体試料展開層は、1層だけに限定する必要はなく、2層以上の非繊維性多孔膜を部分的に配置された接着剤により接着された積層物を用いることがで

きる。また、少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層は特開昭57-66359に開示の物理的活性化処理、好ましくはグロー放電処理またはコロナ放電処理を非繊維性多孔膜の少なくとも片面に施すか、あるいは特開昭55-164356、特開昭57-66359等を開示の界面活性剤含浸処理、好ましくはノニオン性界面活性剤含浸処理、または親水性ポリマー含浸処理等の親水化処理、またはこれらの処理工程の二つ以上の組合せを逐次実施することにより非繊維性多孔膜を親水化し、下側（支持体に近い側）の機能層との接着力の強化、または展開面積のコントロールをすることができる。更に、目的とする検出反応を行うための試薬、該検出反応を促進するための試薬、あるいは干渉・妨害反応を低減又は阻止する為の各種試薬、もしくはこれらの試薬の一部を含ませることができる。

非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層の厚さ、孔径、空隙率、透水速度などに特に制限は無いが、厚さについては50～500 μm 、好ましくは50～350 μm 、更に好ましくは80～200 μm であることが望ましい。孔径については好ましくは0.001～100 μm 、更に好ましくは0.1～50 μm 程度の平均孔径を有するものが望ましい。空隙率については好ましくは50～95%、更に好ましくは60～90%が望ましい。また透水速度については25℃で1Kg/cm²の圧力で水を通過させたときの透水量が好ましくは非繊維性多孔膜1cm²当たり1分間に1～5000ml、更に好ましくは5～2000mlであることが望ましい。

本発明における多孔性液体試料展開層は、非繊維性多孔膜からなるものである。好ましくは、非繊維性多孔膜は有機高分子からなる多孔膜である。上記した有機高分子からなる多孔膜は、対称性膜又は非対称性膜の何れも使用することができる。非対称性多孔膜の場合、非対称率は好ましくは2.0以上であり、対称性多孔膜の場合、非対称率は好ましくは2.0未満である。本明細書で言う非対称性多孔膜とは、一方の表面の平均孔径が他方の表面の平均孔径よりも大きい多孔膜のことであり、非対称率とは、大きい方の平均孔径を小さい方の平均孔径で割っ

た値のことである。

有機高分子からなる多孔膜の好ましい具体例としては、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、またはこれらの混合物などが挙げられる。上記の中でも、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、またはこれらの混合物がさらに好ましく、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはこれらの混合物が特に好ましい。

また、試薬を含有する非繊維性多孔膜は、試薬を含有している膜を指すが、予め多孔膜を試薬溶液に浸漬後、乾燥させることにより試薬含有膜を作製できる。また、別法として多孔膜上に試薬溶液を塗布後乾燥させることにより試薬含有非繊維性多孔膜を作製できるが、特に手段は限定されない。

本発明の多層分析要素は、少なくとも1つの機能層を含む。機能層の数は1以上であれば特に限定されず、1層でもよいし、2層以上の複数の層とすることもできる。

機能層の具体例としては、展開層と機能層を接着する接着層、液状試薬を吸水する吸水層、化学反応により生成した色素の拡散を防止する媒染層、ガスを選択的に透過させるガス透過層、層間での物質移動を抑制・促進させる中間層、内因性物質を除去する除去層、反射測光を安定に行うための光遮蔽層、内因性色素の影響を抑制する色遮蔽層、血球と血漿を分離する分離層、分析対象物と反応する試薬を含む試薬層、発色剤を含む発色層などが挙げられる。

本発明の一例としては、例えば、支持体の上には、場合によっては下塗層等の他の層を介して、機能層として親水性ポリマー層を設けることができる。親水性ポリマー層としては、例えば、無孔性、吸水性かつ水浸透性の層であり、基本的に親水性ポリマーのみなる吸水層、親水性ポリマーをバインダーとし発色反応に直接関与する発色試薬の一部又は全部を含む試薬層、及び親水性ポリマー中に発色色素を固定し不動にする成分（例：媒染剤）を含有する検出層などを設けることができる。

（試薬層）

試薬層は水性液体中の被検成分と反応して光学的に検出可能な変化を生じる試薬組成物の少なくとも一部が親水性ポリマーバインダー中に実質的に一様に分散されている吸水性で水浸透性の層である。この試薬層には指示薬層、発色層なども含まれる。

試薬層のバインダーとして用いることができる親水性ポリマーは、一般には水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然または合成親水性ポリマーである。そのような親水性ポリマーの例としては、特開昭60-108753号公報等に記載されているゼラチン（例、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、アガロース、プルラン、プルラン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等をあげることができる。

試薬層は架橋剤を用いて適宜に架橋硬化された層とすることができる。架橋剤

の例として、ゼラチンに対する 1, 2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタン、ビス（ビニルスルホニルメチル）エーテル等の公知のビニルスルホン系架橋剤、アルデヒド等、メタリルアルコールコポリマーに対するアルデヒド、2個のグリシジル基含有エポキシ化合物等がある。

試薬層の乾燥時の厚さは約 1 μ m から約 100 μ m の範囲であることが好ましく、より好ましくは約 3 μ m から約 30 μ m の範囲である。また試薬層は実質的に透明であることが好ましい。

本発明の多層分析要素の試薬層やその他の層に含める試薬としては、被験物質に応じてその検出に適した試薬を選択することができる。

例えば、アンモニア（被験物質がアンモニア又はアンモニア生成物質である場合）を分析する場合には、呈色性アンモニア指示薬として、ロイコシアニン染料、ニトロ置換ロイコ染料およびロイコフタレイン染料のようなロイコ染料（米国再発行特許第 30267 号明細書または特公昭 58-19062 号公報記載）：ブロムフェノールブルー、ブロムクレゾールグリーン、ブロムチモールブルー、キノリンブルーおよびロゾール酸のような pH 指示薬（共立出版（株）、化学大辞典、第 10 巻 63～65 頁参照）：トリアリールメタン系染料前駆体：ロイコベンジリデン色素（特開昭 55-379 号および特開昭 56-145273 号各公報に記載）：ジアゾニウム塩とアゾ染料カップラー：塩基漂白可能染料等を用いることができる。バインダーの重量に対する呈色性アンモニア指示薬の配合量は約 1～20 重量%の範囲内であることが好ましい。

被験物質であるアンモニア生成物質と反応してアンモニアを生成させる試薬は、酵素または酵素を含有する試薬であることが好ましく、被験物質であるアンモニア生成物質の種類に応じて、分析に適した酵素を選択して用いることができる。上記試薬として酵素を用いる場合には、その酵素の特異性からアンモニア生成物質と試薬の組み合わせが決定される。アンモニア生成物質と試薬としての酵素の組合せの具体例としては、尿素：ウレアーゼ、クレアチニン：クレアチニンデヒミナーゼ、アミノ酸：アミノ酸デヒドロゲナーゼ、アミノ酸：アミノ酸オキシダ

ーゼ、アミノ酸：アンモニアリアーゼ、アミン：アミノキシダーゼ、ジアミン：アミノキシダーゼ、グルコースおよびホスホアミダート：ホスホアミダートヘキソースホスホトランスフェラーゼ、ADP：カルバミン酸塩キナーゼおよび燐酸カルバモル、酸アミド：アミドヒドロラーゼ、ヌクレオ塩基：ヌクレオ塩基デアミナーゼ、ヌクレオシド／ヌクレオシドデアミナーゼ、ヌクレオチド：ヌクレオチドデアミナーゼ、グアニン：グアナーゼ等を挙げることができる。アンモニアを分析する場合の試薬層に用いることができるアルカリ性緩衝剤としては、pHが7.0～12.0、好ましくは7.5～11.5の範囲の緩衝剤を用いることができる。

アンモニアを分析する場合の試薬層には、アンモニア生成物質と反応してアンモニアを生成させる試薬、アルカリ性緩衝剤およびフィルム形成能を有する親水性ポリマーバインダー以外にも必要に応じて湿潤剤、バインダー架橋剤(硬化剤)、安定剤、重金属イオントラップ剤(錯化剤)等を含むことができる。重金属イオントラップ剤は、酵素活性を阻害するような重金属イオンをマスキングするために使用されるものである。重金属イオントラップ剤の具体例としては、EDTA・2Na、EDTA・4Na、ニトリロトリ酢酸(NTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸のようなコンプレクサン(complexane)を挙げることができる。

グルコース測定試薬組成物の例としては、米国特許3,992,158；特開昭54-26793；特開昭59-20853；特開昭59-46854；特開昭59-54962等に記載のグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン又はその誘導体、1,7-ジヒドロキシナフタレンを含む改良Trinder試薬組成物がある。

(光遮蔽層)

前記試薬層の上に必要に応じて光遮蔽層を設けることができる。光遮蔽層は、光吸収性または光反射性(これらを合わせて光遮蔽性という。)を有する微粒子が少量の被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーに分散保持されている水

透過性または水浸透性の層である。光遮蔽層は試薬層にて発生した検出可能な変化（色変化、発色等）を光透過性を有する支持体側から反射測光する際に、後述する展開層に点着供給された水性液体の色、特に試料が全血である場合のヘモグロビンの赤色等、を遮蔽するとともに光反射層または背景層としても機能する。

光反射性を有する微粒子の例としては、二酸化チタン微粒子（ルチル型、アナターゼ型またはブルカイト型の粒子径が約 $0.1 \mu\text{m}$ から約 $1.2 \mu\text{m}$ の微結晶粒子等）、硫酸バリウム微粒子、アルミニウム微粒子または微小フレーク等を挙げることができ、光吸収性微粒子の例としては、カーボンブラック、ガスブラック、カーボンマイクロビーズ等を挙げることができ、これらのうちでは二酸化チタン微粒子、硫酸バリウム微粒子が好ましい。特に好ましいのは、アナターゼ型二酸化チタン微粒子である。

被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーの例としては、前述の試薬層の製造に用いられる親水性ポリマーと同様の親水性ポリマーのほかに、弱親水性の再生セルロース、セルロースアセテート等を挙げることができ、これらのうちではゼラチン、ゼラチン誘導体、ポリアクリルアミド等が好ましい。なお、ゼラチン、ゼラチン誘導体は公知の硬化剤（架橋剤）を混合して用いることができる。

光遮蔽層は、光遮蔽性微粒子と親水性ポリマーとの水性分散液を公知の方法により試薬層の上に塗布し乾燥することにより設けることができる。また光遮蔽層を設ける代りに、前述の展開層中に光遮蔽性微粒子を含有させてもよい。

（接着層）

試薬層の上に、場合によっては光遮蔽層等の層を介して、展開層を接着し積層するために接着層を設けてもよい。

接着層は水で湿潤しているとき、または水を含んで膨潤しているときに展開層を接着することができ、これにより各層を一体化できるような親水性ポリマーからなることが好ましい。接着層の製造に用いることができる親水性ポリマーの例としては、試薬層の製造に用いられる親水性ポリマーと同様な親水性ポリマーがあげられる。これらのうちではゼラチン、ゼラチン誘導体、ポリアクリルアミド

等が好ましい。接着層の乾燥膜厚は一般に約 $0.5 \mu\text{m}$ から約 $20 \mu\text{m}$ 、好ましくは約 $1 \mu\text{m}$ から約 $10 \mu\text{m}$ の範囲である。

なお、接着層は試薬層上以外にも、他の層間の接着力を向上させるため所望の層上に設けてもよい。接着層は親水性ポリマーと、必要によって加えられる界面活性剤等を含む水溶液を公知の方法で、支持体や試薬層等の上に塗布する方法などにより設けることができる。

(吸水層)

本発明の多層分析要素には、支持体と試薬層の間に吸水層を設けることができる。吸水層は水を吸収して膨潤する親水性ポリマーを主成分とする層で、吸水層の界面に到達または浸透した水性液体試料の水を吸収できる層であり、全血試料を用いる場合には水性液体成分である血漿の試薬層への浸透を促進する作用を有する。吸水層に用いられる親水性ポリマーは前述の試薬層に使用されるもののなかから選択することができる。吸水層には一般的にはゼラチンまたはゼラチン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、特に前述のゼラチン又は脱イオンゼラチンが好ましく、試薬層と同じ前述のゼラチンが最も好ましい。吸水層の乾燥時の厚さは約 $3 \mu\text{m}$ から約 $100 \mu\text{m}$ 、好ましくは約 $5 \mu\text{m}$ から約 $30 \mu\text{m}$ の範囲、被覆量では約 $3 \text{g}/\text{m}^2$ から約 $100 \text{g}/\text{m}^2$ 、好ましくは約 $5 \text{g}/\text{m}^2$ から約 $30 \text{g}/\text{m}^2$ の範囲である。吸水層には後述する pH 緩衝剤、公知の塩基性ポリマー等を含有させて使用時（分析操作実施時）の pH を調節することができる。さらに吸水層には公知の媒染剤、ポリマー媒染剤等を含有させることができる。

(検出層)

検出層は、一般に、被検成分の存在下で生成した色素等が拡散し、支持体を通して光学的に検出され得る層で、親水性ポリマーにより構成することができる。媒染剤、例えばアニオン性色素に対してカチオン性ポリマーを、含んでもよい。吸水層は、一般に、被検成分の存在下で生成する色素が実質的に拡散しないような層を言い、この点で検出層とは区別される。

試薬層、吸水層、接着層、展開層等には界面活性剤を含有させることができる。その例としてノニオン性界面活性剤がある。ノニオン性界面活性剤の具体例として、p-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、p-ノニルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、p-ノニルフェノキシポリグリシドール、オクチルグルコシド等がある。ノニオン性界面活性剤を展開層に含有させることにより水性液体試料の展開作用（メータリング作用）がより良好になる。ノニオン性界面活性剤を試薬層又は吸水層に含有させることにより、分析操作時に水性液体試料中の水が試薬層または吸水層に実質的に一様に吸収されやすくなり、また展開層との液体接触が迅速に、かつ実質的に一様になる。

非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層を試薬層、吸水層または接着層等の機能層にラミネートするには特開昭55-164356、特開昭57-66359等の開示の方法に従うことができる。すなわち試薬層、吸水層または接着層等の機能層が塗布後未乾燥のうちに、または乾燥後の機能層に水、界面活性剤を含む水溶液、界面活性剤と親水性ポリマーを含む水溶液、有機溶媒または有機溶媒を含有する水溶液等をワイヤーバー塗布装置及びダイを用いた塗布装置等で実質的に均一に供給し、機能層を膨潤または溶解させ、ついで非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層を膨潤または溶解している機能層の上に実質的に均一に軽く圧力をかけながらラミネートし、一体化する。機能層の膨潤または溶解に際しては、赤外線ヒーター等の輻射エネルギーの照射による加温、支持体にヒーターを接触させ加温する方法等を用いることができる。

本発明の多層分析要素が対象とする被検物質は特に限定されず、任意の液体試料（例えば、全血、血漿、血清、リンパ液、尿、唾液、髄液、腔液などの体液；あるいは飲料水、酒類、河川水、工場廃水等）中の特定成分を分析することができる。例えば、アルブミン（ALB）、グルコース、尿素、ビリルビン、コレステロール、タンパク質、酵素（例えば、LDH（乳酸脱水素酵素）、CPK（クレアチンキナーゼ）、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）、AST（ア

スパルテートアミノトランスフェラーゼ)、 γ GT (γ -グルタミルトランスペプチダーゼ)等の血中酵素)などを分析することができる。

本発明の多層分析要素は、公知の方法により調製することができる。溶血試薬は塗布または含浸される試薬水溶液に予め加えておけばよい。他の方法としては、単独又は界面活性剤・展開面積制御のための親水性ポリマーなどを含む水溶液、有機溶媒(エタノール、メタノールなど)溶液又は水-有機溶媒混合液溶液を展開層の上から塗布して含浸させることもできる。これを用いた被験物質の分析も公知の方法に従って行なうことができる。

例えば、本発明の多層分析要素は、一辺約5mmから約30mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-283331号公報(対応米国特許4,169,751)、実開昭56-142454号公報(対応米国特許4,387,990)、特開昭57-63452号公報、実開昭58-32350号公報、特表昭58-501144号公報(対応国際公:WO083/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることができ、これは製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、又は小片を開口のある容器内に収めて用いたり、又は小片を開口カードに貼付または収めて用いたり、あるいは裁断した小片をそのまま用いることなどもできる。

本発明の多層分析要素は、例えば約2 μ L~約30 μ L、好ましくは4 μ L~15 μ Lの範囲の水性液体試料液を、多孔性液体試料展開層に点着する。点着した多層分析要素を約20 $^{\circ}$ C~約45 $^{\circ}$ Cの範囲の一定温度で、好ましくは約30 $^{\circ}$ C~約40 $^{\circ}$ Cの範囲内の一定温度で1~10分間インキュベーションする。多層分析要素内の発色又は変色を支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中の被験物質の量を求めることができる。

測定操作は特開昭60-125543号公報、特開昭60-220862号公報、特開昭61-294367号公報、特開昭58-161867号公報(対応米国特許4,424,191)などに記載の化学分析装置により極めて容易な操

作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行ってもよい。

本発明の多層分析要素は、分析を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないいわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1：展開層素材の折り曲げ時の破壊されやすさ比較

ポリスルホン膜（SE-200：富士写真フイルム社製、以下PS膜とする）、ポリエーテルスルホン膜（プレシジョン：ポール社製、以下PES膜とする）、酢酸セルロース膜（FM-300：富士写真フイルム社製、以下FM膜とする）を各々2cm×5cmの短冊状に切り取り、本短冊の両端を重ね合わせ、中心に形成されるループ部分に50、20、10gの分銅を静かに置き、2～3秒間静置する。続いて本短冊を反対方向に折り曲げ、先ほど折った部分に再び上記分銅をのせ、2～3秒間静置する。本操作を行なった後に短冊が切れる頻度を確認した。表1に本試験を実施した時に切断した短冊数の結果を示す。

表1．折り曲げ試験評価結果

分銅重量 (g/重)	PS膜	PES膜	FM膜
50	0枚／5枚	0枚／5枚	5枚／5枚
20	0枚／5枚	0枚／5枚	5枚／5枚
10	0枚／5枚	0枚／5枚	3枚／5枚

F M膜は20 g重以上で100%切れるのに対して、P S膜、P E S膜は切れないことが確認できた。以上の結果からもP S膜、P E S膜は製造時の取扱いにおける安定性が非常に高いことがわかる。

実施例2：展開層素材の伸張率比較

ポリスルホン膜（S E－200：富士写真フイルム社製、以下P S膜とする）、ポリエーテルスルホン膜（プレシジョン：ポール社製、以下P E S膜とする）、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編物布地（以下編物布地とする）を2 cm×8 cmの短冊状に切り取り、膜の両端にテープを貼り、片方に穴を開ける。穴の開いていない側をクリップで固定し、吊るした状態にし、無負荷状態での短冊の長さを測定する。その後穴に50 g重の分銅を吊り下げ、負荷状態での短冊の長さを測定し、伸張率を算出した。測定は22℃、湿度36%下で実施した。表2に本試験によって求めた伸張率を示す。

表2

表2. 50 g重で引っ張った時の伸張率結果

	P S 膜	P E S 膜	編物布地
無負荷時の長さ (cm)	4.98	4.93	5.05
負荷時の長さ (cm)	4.98	4.93	5.18
伸 張 率	0.0%	0.0%	2.6%

編物布地は本試験条件において伸びるのに対して、P S膜、P E S膜は全く伸びないことが確認できた。以上の結果からP S膜、P E S膜は製造時の変化が無く、ロット内差、ロット間差が小さくできる。

実施例 3 : 各種展開層素材を用いた C a、A L B、A L T 分析用多層分析要素の感度及び精度結果

(1) ポリスルホン膜を展開層に用いた C a 分析用多層分析要素の作製方法

ゼラチン下塗りされている $180\ \mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液 (pH=5.6) を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し吸水層とした。

ゼラチン $11.7\ \text{g}/\text{m}^2$

1 N 水酸化カリウム $1.2\ \text{g}/\text{m}^2$

酸化チタン $0.8\ \text{g}/\text{m}^2$

ポリオキシ (2-ヒドロキシ) プロピレンノニルフェニルエーテル $0.3\ \text{g}/\text{m}^2$

次に上記吸水層上に下記組成の水溶液 (pH=5.3) を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し試薬層とした。

ゼラチン $11.9\ \text{g}/\text{m}^2$

2-モルホリノエタンスルホン酸・1水和物 $6.4\ \text{g}/\text{m}^2$

1 N 水酸化カリウム $7.0\ \text{g}/\text{m}^2$

C P A (III) $0.4\ \text{g}/\text{m}^2$

ポリオキシ (2-ヒドロキシ) プロピレンノニルフェニルエーテル $0.4\ \text{g}/\text{m}^2$

ジーイソーオクチルソディウムスルホサクシネート $0.1\ \text{g}/\text{m}^2$

次に上記試薬層上に約 $15\ \text{g}/\text{m}^2$ の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、ポリスルホン膜 (SE-200 : 富士写真フイルム社製、以下 P S 膜とする) を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。以上によりポリスルホン膜を展開層に用いた C a 分析用多層分析要素を作製した。

上記の多層分析要素を $12\ \text{mm} \times 13\ \text{mm}$ 四方のチップに裁断し、スライド枠 (特開昭 57-63452 号公報に記載) に収めて、C a 分析用スライド 1 を作製した。

(2) 編物布地を展開層に用いた C a 分析用多層分析要素の作製方法

試薬層までは（１）ポリスルホン膜を展開層に用いたCa分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、試薬層上に約 30 g/m^2 の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編物布地（以下編物布地とする）を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。

上記布地上に、下記組成のエタノール溶液を下記の被覆量になるように塗布、乾燥させ、編物布地を展開層に用いたCa分析用多層分析要素を作製した。

ポリビニルピロリドン 3.3 g/m^2

ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル 0.4 g/m^2

上記の多層分析要素を $12\text{ mm} \times 13\text{ mm}$ 四方のチップに裁断し、スライド枠（特開昭57-63452号公報に記載）に収めて、Ca分析用スライド2を作製した。

（３）感度及び測定精度比較

上記Ca分析用スライド1、2に水及びCa濃度が 15.2 mg/dl である管理血清を各々 $10\text{ }\mu\text{L}$ 点着した。この後、各スライドを 37°C でインキュベーションし、支持体側から 625 nm の反射光学濃度を測定し、点着後4分後の反射光学濃度を求め、感度（ 15.2 mg/dl である管理血清を点着した時の反射光学濃度と水を点着した時の反射光学濃度の差（ $\text{dODr} (15.2\text{ mg/dl} - 0\text{ mg/dl})$ ））を比較した。また、Ca濃度が6.1、9.7、 15.2 mg/dl の管理血清を $10\text{ }\mu\text{L}$ 点着した時の精度（CV（%））を比較した。表3に感度比較結果、表4に精度比較結果を示す。

表 3. 感度比較結果

	感度<d0Dr (15.2mg/dl-0mg/dl)>	感 度 比
Ca 分析用乾式スライド 1	0.350	1.13
Ca 分析用乾式スライド 2	0.310	1

表 4. 精度 (C V (%)) 比較結果

Ca 濃度 (mg/dl)	Ca 分析用乾式スライド 1	Ca 分析用乾式スライド 2
6.1	1.2%	1.5%
9.7	0.7%	0.9%
15.2	0.7%	1.0%

P S 膜を展開層に用いた C a 分析用多層分析要素 1 は編物布地を展開層に用いた C a 分析用多層分析要素 2 に対し、感度が向上する。さらに測定精度の向上も達成された。

(4) ポリスルホン膜を展開層に用いた A L B 分析用多層分析要素の作製方法

ゼラチン下塗りされている $180\mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液 (p H = 2.8) を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し試薬層とした。

アクリルアミド-N-ビニルピロリドン 49.6 g/m^2

-メタクリルアルコール共重合体

D L -リンゴ酸 4.8 g/m^2

ブロモクレゾールグリーン 0.7 g/m^2

グリセリン 4.8 g/m^2

ポリオキシ (2-ヒドロキシ) プロピレンノニルフェニルエーテル 1.5 g/m^2

次に上記試薬層上に約 15 g/m^2 の供給量で水-エタノール (1 : 1) 混合

液を全面に供給して湿潤させた後、ポリスルホン膜（SE-200：富士写真フイルム社製、以下PS膜とする）を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。

以上によりポリスルホン膜を展開層に用いたALB分析用多層分析要素を作製した。

上記の多層分析要素を12mm×13mm四方のチップに裁断し、スライド枠（特開昭57-63452号公報に記載）に収めて、ALB分析用スライド1を作製した。

（５）編物布地を展開層に用いたALB分析用多層分析要素の作製方法

試薬層までは（４）ポリスルホン膜を展開層に用いたALB分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、試薬層上に約30g/m²の供給量で水-エタノール（1：1）混合液を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編物布地（以下編物布地とする）を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。

上記布地上に、下記組成のエタノール溶液を下記の被覆量になるように塗布、乾燥させ、編物布地を展開層に用いたALB分析用多層分析要素を作製した。

ポリビニルピロリドン 6.6 g/m²

DL-リンゴ酸 6.6 g/m²

ポリオキシエチレン（7）オレイルエーテル 3.3 g/m²

上記の多層分析要素を12mm×13mm四方のチップに裁断し、スライド枠（特開昭57-63452号公報に記載）に収めて、ALB分析用スライド2を作製した。

（６）感度及び測定精度比較

上記ALB分析用スライド1、2に水及びALB濃度が6.0g/dlである管理血清を各々10μL点着した。この後、各スライドを37℃でインキュベ-

ションし、支持体側から 625 nm の反射光学濃度を測定し、点着後 4 分後の反射光学濃度を求め、感度 (6.0 g/dl である管理血清を点着した時の反射光学濃度と水を点着した時の反射光学濃度の差 ($dOD_r (6.0 \text{ g/dl} - 0 \text{ g/dl})$)) を比較した。また、ALB 濃度が 1.7、3.9、6.0 g/dl の管理血清を 10 μ L 点着した時の精度 (標準偏差 $<SD> \text{ g/dl}$) を比較した。表 5 に感度比較結果、表 6 に精度比較結果を示す。

表 5. 感度比較結果

	感度 $<dOD_r (6.0 \text{ g/dl} - 0 \text{ g/dl})>$	感 度 比
ALB 分析用乾式スライド 1	0.766	1.08
ALB 分析用乾式スライド 2	0.707	1

表 6. 精度 (標準偏差 $<SD> \text{ g/dl}$) 比較結果

ALB 濃度 (g/dl)	ALB 分析用乾式スライド 1	ALB 分析用乾式スライド 2
1.7	0.04	0.03
3.9	0.04	0.08
6.0	0.01	0.10

PS 膜を展開層に用いた ALB 分析用多層分析要素 1 は編物布地を展開層に用いた ALB 分析用多層分析要素 2 に対し、感度が向上する。さらに測定精度の向上も達成された。

(7) ポリスルホン膜を展開層に用いた ALT 分析用多層分析要素の作製方法
ゼラチン下塗りされている 180 μ m のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液 (pH=6.5) を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し試薬層とした。

ゼラチン	18.5 g/m ²
ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンノニルフェニルエーテル	0.7 g/m ²
ペルオキシダーゼ	14.8KU/m ²
フラビンアデニンジヌクレオチド2ナトリウム	0.02 g/m ²
コカルボキシラーゼ	0.09 g/m ²
2-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル] -5-フェネチルイミダゾール(ロイコ色素)酢酸塩	0.28 g/m ²
ピルビン酸オキシダーゼ	3.4KU/m ²
ビス[(ビニルスルホンニルメチルカルボニル)アミノ]メタン	0.6 g/m ²

次に上記試薬層上に約15 g/m²の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、ポリスルホン膜(SE-200:富士写真フイルム社製、以下PS膜とする)を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。

上記ポリスルホン膜上に、下記組成の水溶液(pH=7.5)を下記の被覆量になるように塗布、乾燥させ、ポリスルホン膜を展開層に用いたALT分析用多層分析要素を作製した。

ポリエチレングリコール(10)オクチルフェニルエーテル	0.2 g/m ²
ポリエチレングリコール(40)オクチルフェニルエーテル	1.32 g/m ²
セルロースエーテル(メトロース90SH100)	0.83 g/m ²
トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	0.36 g/m ²
リン酸1カリウム	0.43 g/m ²
α-ケトグルタル酸2ナトリウム2水和物	0.38 g/m ²
L-アラニン	2.6 g/m ²
塩化マグネシウム6水和物	0.23 g/m ²
アスコルビン酸オキシダーゼ	4.5 KU/m ²

上記の多層分析要素を12mm×13mm四方のチップに裁断し、スライド枠(特開昭57-63452号公報に記載)に収めて、ALT分析用スライド1を作製した。

(8) 織物布地を展開層に用いたALT分析用多層分析要素の作製方法

試薬層までは(7)ポリスルホン膜を展開層に用いたALT分析用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、試薬層上に約 30 g/m^2 の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、60番手相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸で織られたブロード布地(以下織物布地とする)を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。さらに本布地上に、(7)ポリスルホン膜を展開層に用いたALT分析用多層分析要素の作製方法と同様な水溶液を塗布、乾燥させ、織物布地を展開層に用いたALT分析用多層分析要素を作製した。

上記の多層分析要素を $12\text{ mm} \times 13\text{ mm}$ 四方のチップに裁断し、スライド枠(特開昭57-63452号公報に記載)に収めて、ALT分析用スライド2を作製した。

(9) 感度及び測定精度比較

上記ALT分析用スライド1、2に水及びALT活性が 841 U/L である管理血清を各々 $10\text{ }\mu\text{L}$ 点着した。この後、各スライドを 37°C でインキュベーションし、支持体側から 650 nm の反射光学濃度を測定し、点着後3から4分後の反射光学濃度の変化量を求め、感度(841 U/L である管理血清を点着した時の反射光学濃度の変化量と水を点着した時の反射光学濃度の変化量の差($\text{ddODr}(841\text{ U/L}-0\text{ U/L})$))を比較した。また、ALT活性が388、 841 U/L の管理血清を $10\text{ }\mu\text{L}$ 点着した時の精度精度(CV(%))を比較した。表7に感度比較結果、表8に精度比較結果を示す。

表7. 感度比較結果

	感度 <ddODr(841U/L-0U/L)>	感度比
ALT 分析用スライド1	0.240	1.39
ALT 分析用スライド2	0.173	1

表 8. 精度 (CV (%)) 比較結果

ALT 活性 (U/L)	ALT 分析用スライド 1	ALT 分析用スライド 2
3 8 8	1.2%	2.2%
8 4 1	1.1%	3.3%

P S 膜を展開層に用いた A L T 分析用多層分析要素 1 は織物布地を展開層に用いた A L T 分析用多層分析要素 2 に対し、感度が向上する。さらに測定精度の向上も達成された。

実施例 4：各種展開層素材を用いた反射光量のムラ及び測光面積を小さくしたときの測定バラツキの比較

(1) ポリスルホン膜を展開層に用いた反射光量測定用多層分析要素の作製方法

ゼラチン下塗りされている $180\ \mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液 ($\text{pH}=5.1$) を、下記の被覆量になるように塗布、乾燥し吸水層とした。

ゼラチン $16.6\ \text{g}/\text{m}^2$

ポリオキシ (2-ヒドロキシ) プロピレンノニルフェニルエーテル $0.2\ \text{g}/\text{m}^2$

次に上記試薬層上に約 $15\ \text{g}/\text{m}^2$ の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、ポリスルホン膜 (S E - 2 0 0 : 富士写真フイルム社製、以下 P S 膜とする) を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。以上によりポリスルホン膜を展開層に用いた反射光量測定用多層分析要素を作製した。

上記の多層分析要素を $12\ \text{mm} \times 13\ \text{mm}$ 四方のチップに裁断し、スライド枠 (特開昭 5 7 - 6 3 4 5 2 号公報に記載) に収めて、反射光量測定用スライド 1 を作製した。

(2) 編物布地を展開層に用いた反射光量測定用多層分析要素の作製方法

試薬層までは (1) ポリスルホン膜を展開層に用いた反射光量測定用多層分析要素の作製方法と同様に作製し、試薬層上に約 $30\ \text{g}/\text{m}^2$ の供給量で水を全面

に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編物布地（以下編物布地とする）を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させて、接着させた。以上により編物布地を展開層に用いた反射光量測定用多層分析要素を作製した。

上記の多層分析要素を12mm×13mm四方のチップに裁断し、スライド枠（特開昭57-63452号公報に記載）に収めて、反射光量測定用スライド2を作製した。

（3）反射光量のムラ比較

上記反射光量測定用スライド1、2を図1に示すような光学配置の測光系を用いて支持体側から測定し、直径6mmの測光面積を33 μ m/ピクセルで反射測光したときの反射ODの変動係数（CV（%））を比較した。結果を表9に示す。光学系；倒立の実体顕微鏡の光学系を使用。CCD受光部での倍率は、1倍；CCD部分で10 μ m/ピクセル、0.33倍；CCD部分で33 μ m/ピクセル光源；林時計工業株式会社製のルミナーエース LA-150UX

干渉フィルタ 625nm, 540nm, 505nmで各々単色化減光フィルタ；HOYA株式会社製のガラスフィルタ ND-25およびステンレス板に孔をあけた自家製フィルタを使用。

CCD；SONY株式会社製の8ビット白黒カメラモジュール XC-7500を使用。

データ処理；株式会社ニレコ製の画像処理装置 LUZEX-SEを用いて、得られた画像を処理して計測。

反射光学濃度を校正するための手段として、富士機器工業株式会社製の標準濃度板（セラミック仕様）を使用。標準濃度板は、A00（反射光学濃度～0.05）、A05（同0.5）、A10（同1.0）、A15（同1.5）、A20（同2.0）、A30（同3.0）の6種類を使用した。

表 9. 直径 6mm の測光面積を $33 \mu\text{m}$ / ピクセルで反射測光したときの
反射 OD の変動係数 (CV(%)) 比較

	反射光量測定用乾式スライド 1	反射光量測定用乾式スライド 2
反射 OD の平均値	0.296	0.391
標準偏差 (SD)	0.010	0.097
変動係数 (CV(%))	3.4%	25%
最大値	0.333	0.771
最小値	0.260	0.275

編物布地を展開層に用いた反射光量測定用スライド 2 は編目の影響で反射 OD の CV が非常に大きいのに対し、PS 膜を用いた反射光量測定用スライド 1 は反射 OD の CV が極めて小さいことが確認できた。

(4) 測光面積を小さくしたときの測定バラツキの比較

上記反射光量測定用スライド 1、2 を図 1 に示すような光学配置の $10 \mu\text{m}$ / ピクセルの測光系を用いて、支持体側から測光面積が直径 3 mm から直径 0.4 mm の場合で、各 $n = 10$ の出し入れを繰り返し反射測光し、各測光面積毎の標準偏差 (SD) を比較した。このとき比較対照として標準濃度板 A05 についても同様の測定を実施した。結果を表 10 及び図 2 に示す。

表 10. 反射 OD の標準偏差 (SD) の測光面積との関係

測光直径 (mm)	0.4	1	2	3
反射光量測定用乾式スライド 1	0.00142	0.00079	0.00097	0.00056
反射光量測定用乾式スライド 2	0.00673	0.00327	0.00200	0.00053
標準濃度板 A05	0.00061	0.00024	0.00029	0.00034

編物布地を展開層に用いた反射光量測定用スライド２は測光面積を縮小すると反射ODの標準偏差が大きくなるのに対し、PS膜を用いた反射光量測定用スライド１は標準偏差の変動が小さく、液体試料の微量化による測光面積の縮小化に際しても、高精度の測定が可能となる。

産業上の利用可能性

本発明の多層分析要素においては、折り曲げ破壊強度が20g重以上であり、50g重で引っ張った時の伸張率が2%以下である非繊維性多孔膜を展開層として用いることによって、製造時の展開層の切れ（展開層と下層との接着工程）等が発生しないという効果が得られ、また伸張率が低いことで空隙体積が変化しないという効果が得られる。これにより、ロット間差及びロット内差が小さく、測定精度が高く、小型化可能で、さらに製造の安定化が可能になる多層分析要素を提供することができる。

請求の範囲

1. 水不透過性平面支持体の片面上に、少なくとも1つの機能層と少なくとも1つの非繊維性多孔膜からなる多孔性液体試料展開層がこの順に積層一体化された液体試料分析用多層分析材料において、該非繊維性多孔膜の折り曲げ破壊強度が20 g重以上であり、かつ50 g重で引っ張った時の伸張率が2%以下である液体試料分析用多層分析要素。

2. 非繊維性多孔膜が有機高分子からなる多孔膜である、請求項1記載の液体試料分析用多層分析要素。

3. 有機高分子からなる多孔膜が非対称性多孔膜であり、非対称率が2.0以上である、請求項2記載の液体試料分析用多層分析要素。

4. 有機高分子からなる多孔膜が対称性多孔膜であり、非対称率が2.0未満である、請求項2記載の液体試料分析用多層分析要素。

5. 有機高分子からなる多孔膜が6, 6-ナイロン、6-ナイロン、アクリレート共重合体、ポリアクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリアクリロニトリル共重合体、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリウレタン、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレンクロロトリフルオロエチレン共重合体、ポリエチレンテトラフルオロエチレン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリオレフィン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリフェニレンスルフィド、ポリフェニレンオキシド、ポリフルオロカーボネート、ポリプロピレン、ポリベンズイミダゾール、ポリメタクリル酸メチル、スチレン-アクリロニトリル共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、エチレン-酢酸ビニル共重合体の鹼化物、ポリビニルアルコール、またはこれらの混合物である、請求項2から4の何れかに記載の液体試料分析用多層分析要素。

6. 有機高分子からなる多孔膜が、6, 6-ナイロン、6-ナイロン、ポリ

エーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホンとポリスルホンの混合物、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリエステルカーボネート、ポリフェニレンオキシド、ポリアミド、ポリイミド、ポリアミドイミド、またはこれらの混合物である、請求項 2 から 4 の何れかに記載の液体試料分析用多層分析要素。

7. 有機高分子からなる多孔膜がポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはこれらの混合物である、請求項 2 から 4 の何れかに記載の液体試料分析用多層分析要素。

図 1

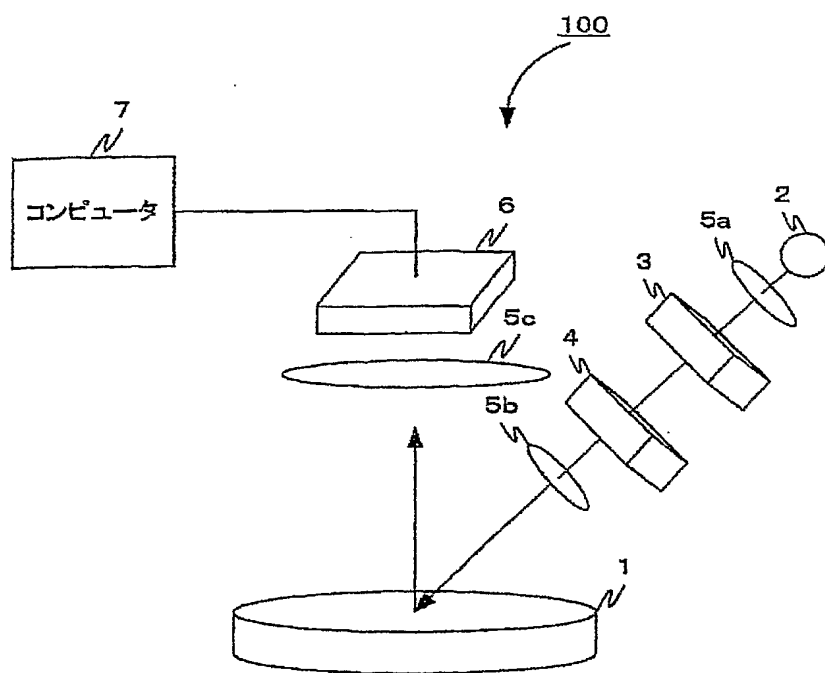
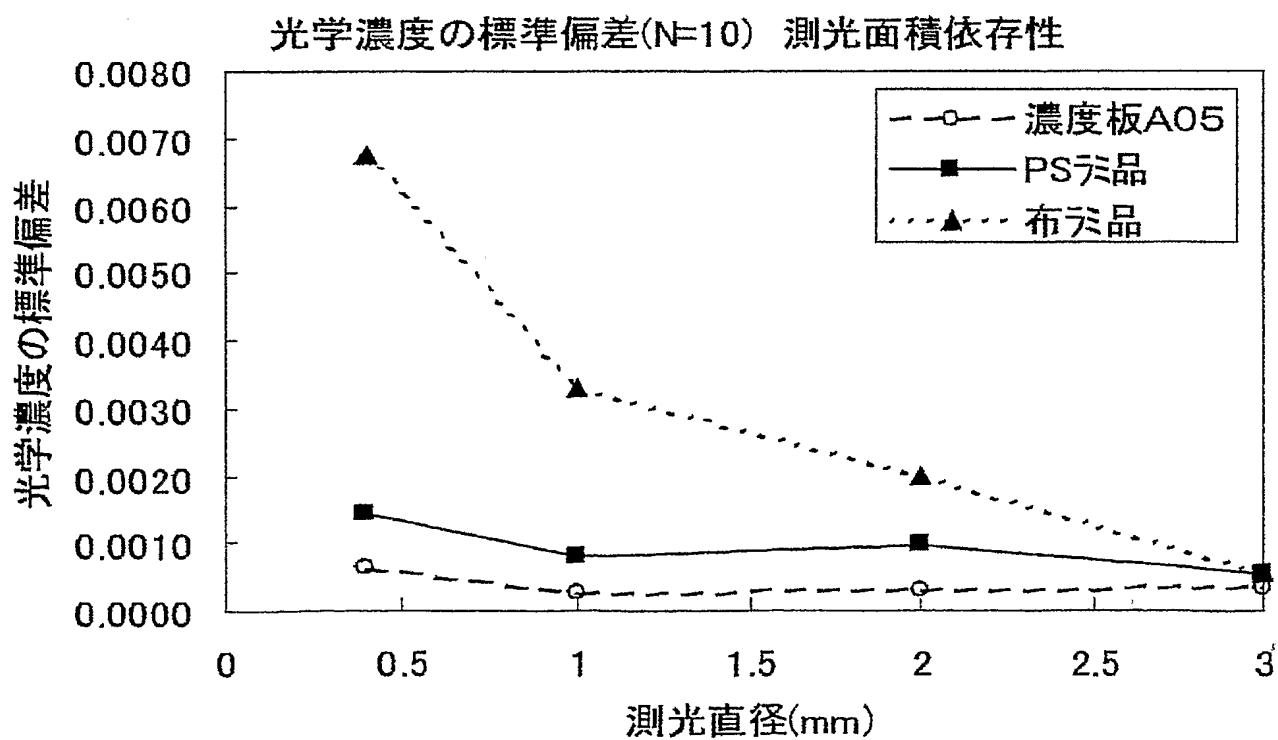


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/52, G01N31/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-350437 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 04 December, 2002 (04.12.02), Claims; Par. Nos. [0024] to [0026] (Family: none)	1-7
Y	JP 2000-074907 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 14 March, 2000 (14.03.00), Par. No. [0035] (Family: none)	1-7
Y	JP 2000-180443 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 30 June, 2000 (30.06.00), Par. No. [0037] & US 6375856 B	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March, 2005 (16.03.05)

Date of mailing of the international search report

05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003085

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-194126 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 21 July, 1999 (21.07.99), Par. No. [0042] (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/52, G01N31/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-350437 A(富士写真フイルム株式会社) 2002.12.04 特許請求の範囲、【0024】～【0026】等参照 (ファミリーなし)	1-7
Y	JP 2000-074907 A(富士写真フイルム株式会社) 2000.03.14 【0035】等参照 (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.03.2005

国際調査報告の発送日

05.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-180443 A(富士写真フイルム株式会社) 2000. 06. 30 【0037】等参照 & US 6375856 B	1-7
Y	JP 11-194126 A(富士写真フイルム株式会社) 1999. 07. 21 【0042】等参照 (ファミリーなし)	1-7